Aus dem Physiologischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.med. Otto H. G a u e r

Die Freisetzung von Acetylcholin an der motorischen Nervenendigung unter dem Einfluß von d-Tubocurarin

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:

Hartmut Bauer
aus Greifswald

1970

Dekan: Professor Dr.med. Herbert L a x

Referent: Professor Dr.med. Otto H. G a u e r

Korreferent: Professor Dr.med. Helmut K e w i t z

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promoviert am: 2.6.1970

Pflügers Arch. 326, 162—183 (1971)
© by Springer-Verlag 1971

Die Freisetzung von Acetylcholin an der motorischen Nervenendigung unter dem Einfluß von d-Tubocurarin

H. Bauer*

Physiologisches Institut der Freien Universität Berlin

Eingegangen am 12. März 1971

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

esterasen — in die Badflüssigkeit freigesetzte ACh im biologischen Test bestimmt. Ihre Ergebnisse wurden von Nachuntersuchern, die dieselbe Methode wählten, teilweise bestätigt (Chang et al., 1967; Cheymol et al., 1962; Krnjevic u. Miledi, 1959). Andererseits wurde von Beani, Bianchi u. Ledda (1964) eine frequenz- und temperaturabhängige Hemmung der ACh-Freisetzung durch d-Tubocurarin beschrieben.

Naess (1952, 1953) und Lilleheil u. Naess (1960, 1961) folgerten aus extracellulären Ableitungen der Endplattenpotentiale (EPP), daß die sog. Wedensky-Hemmung, d.h. die Abnahme der EPP-Amplitude während frequenter Reizung, durch Curare verursacht wird. Intracelluläre Ableitungen zur Frage einer derartigen präsynaptischen Wirkung von Curare wurden nur vereinzelt unter speziellen experimentellen Bedingungen im Rahmen allgemeinerer Problemstellungen durchgeführt (Beránek u. Vyskočil, 1967; Goldsmith, 1963; Martin, 1955; Otsuka u. Nonomura, 1962).

In dieser Arbeit soll durch Verwendung verschiedener Reizmuster bei unterschiedlichem Ionenmilieu ein Einfluß von d-Tubocararin (d-TC) auf verschiedene Vorgänge in der präsynaptischen Nervenendigung systematisch untersucht werden, die die ACh-Nachlieferung und den Freisetzungsprozeß bestimmen. Bei der Unterscheidung verschiedener Teilfunktionen des Freisetzungsmechanismus wurde von experimentell überprüften Modellvorstellungen ausgegangen, wie sie von Liley u. North (1963), Birks u. Mac Intosh (1961), Elmqvist u. Quastel (1965) und Krukkenberg (1968a, et al., 1966, 1968b) entwickelt worden sind.

Methodik

Von 60—80 g schweren männlichen Goldhamstern wurden Hemidiaphragma-Phrenicus-Präparate hergestellt und in einer Badkammer nach Dehnung um etwa ein Viertel der Ruhelänge eingespannt.

Die Badflüssigkeit wurde mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) durchperlt und bei einer Temperatur von 30° C konstant gehalten. Die verwandte Krebs-Lösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM/l): NaCl 118,5, $NaHCO_3$ 24,9, $CaCl_2$ 2,54, $MgSO_4$ 1,12, KH_2PO_4 1,12, KCl 4,74, Cholin 4,8 · 10^{-2} (Fa. Merck) Glucose 1,0 g/l. In einigen Versuchen wurden die Konzentrationen von Ca^{++} und Mg^{++} geändert (vgl. Ergebnisse). Curare wurde als d-Tubocurarin (Curarin-ASTA)[1] in einem Konzentrationsbereich von 0,1—8 · 10^{-6} g/ml verwandt.

Der Phrenicus wurde über eine Saugelektrode supramaximal gereizt (Grass Stimulator S 4 mit Isoliereinheit, Impulsdauer 0,15—0,25 msec).

Die zur Ableitung verwandten Mikrocapillaren hatten Widerstände von 10 bis 30 MΩ. Das Membranpotential wurde in konventioneller Weise nach Impedanzwandlung sowie DC- und AC-Vorverstärkung (Grass P6, P5) auf einem Kathodenstrahloszillographen (Tektronix Type 502) verfolgt und meist photographisch registriert. In diesen Versuchen erfolgte die Auswertung der Amplituden der Endplattenpotentiale (EPP) und Miniaturendplattenpotentiale (MEPP) von Hand. In

[1] Wir danken der Fa. ASTA für die Überlassung von Versuchsmengen.

anderen Experimenten wurden die Potentialmessungen auf einem Magnetband (AMPEX) gespeichert und mit Hilfe eines Digitalrechners (Linc 8) ausgewertet (Kruckenberg u. Bauer, 1969).

Die Membranpotentialableitungen an einer Endplatte (EP) differierten in ihrer Dauer zwischen 1 und 6 Std. Im Verlauf einiger längerer Versuche erfolgte ein allmählicher Abfall des Membran-Ruhepotentials. Ausgewertet wurden nur Versuche, bei denen das Ruhepotential größer als 55 mV war und während der Messungen bei einer Curarekonzentration um weniger als 10% abfiel.

Berechnung der ACh-Freisetzung

Die Zahl m der einer mittleren EPP-Amplitude entsprechenden Quanten wurde aus dem Variationskoeffizienten der Amplituden einer Potentialserie nach der Formel $m = \frac{1}{(CV)^2}$ berechnet. Von einer Korrektur zur Berücksichtigung der Streuung der Einzelquanten bzw. des Rauschpegels wurde abgesehen (vgl. Martin, 1966), so daß die wirklichen Werte für m etwas höher liegen dürften als die angegebenen. Bei den Computerauswertungen wurde der Rauschpegel gemessen. Die Werte lagen zwischen 20 und 50 μV. Die Standardabweichungen der EPP-Amplituden betrugen minimal 120 μV, in den meisten Versuchen mehr als 150 μV. Der durch die Vernachlässigung des Rauschens verursachte Fehler hinsichtlich der Quantenzahlberechnung lag unter 15%, meist auch unter 10%. Die Depolarisationswirkung des Einzelquants (indirekt gemessene MEPP-Amplitude) wurde durch Division der mittleren EPP-Amplitude durch die mittlere Quantenzahl bestimmt, da im Bereich der gemessenen EPP-Amplituden (bis zu 3 mV) eine praktisch lineare Summation der Depolarisationswirkung vorausgesetzt werden darf (Martin, 1955).

Ergebnisse

Die Spontanfreisetzung von ACh

Die Spontanfreisetzung von ACh an den motorischen Nervenendigungen, gemessen an der Zahl der pro Zeiteinheit registrierten Miniaturendplattenpotentiale (MEPP) (Fatt u. Katz, 1952; Furukawa et al., 1957; Katz, 1962), wird durch verschiedene experimentelle Bedingungen in ähnlicher Weise beeinflußt wie die Freisetzung durch ein Aktionspotential (AP) in der motorischen Nervenendigung. Deshalb haben wir zunächst den Einfluß von Curare auf die spontane Freisetzung von ACh untersucht.

An 18 Endplatten wurden MEPP in curarefreier Badlösung und bei Curarekonzentrationen von $1-4 \cdot 10^{-7}$ g/ml d-TC abgeleitet. Die mittlere MEPP-Rate pro Sekunde wurde für jede Curarekonzentration ermittelt und zur Spontanrate in curarefreier Badlösung in Beziehung gesetzt (Tab. 1).

Daraus ergibt sich, daß eine signifikante Beeinflussung der Spontanfreisetzung in dem Bereich der angegebenen Curarekonzentrationen nicht vorliegt.

Die ACh-Freisetzung durch Reizung

Bei frequenter Reizung bleibt die durch ein Aktionspotential (AP) in der motorischen Nervenendigung freigesetzte Menge an ACh, gemessen an

Tabelle 1. *Spontanfreisetzung- MEPP-Rate (in Prozent der Spontanrate in curarefreier Lösung) an 18 Endplatten*

d-TC (g/ml)	$1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$
MW $\pm$ σ_M	$94{,}6 \pm 6{,}1\%$	$90{,}6 \pm 10{,}4\%$	$109{,}2 \pm 15{,}9\%$

Mittlere Spontanrate in curarefreier Lösung: 43/min (29° C), Ableitungszeitraum: 5—10 min.

der Zahl an ACh-Quanten nicht konstant, sondern sie verändert sich abhängig von der initialen Freisetzung und der Reizfrequenz. Aus diesem Phänomen sind Modelle über den Freisetzungsprozeß entwickelt worden (Elmqvist u. Quastel, 1955; Kruckenberg, 1968a und b; Liley u. North, 1953), die verschiedene Teilfunktionen des Freisetzungsmechanismus erkennen lassen: Ein kleines Reservoir an sofort freisetzbaren ACh-Vesikeln wird aus einem ca. 100mal größeren Speicher nach jeder Freisetzung aufgefüllt, die Menge im Speicher wird durch Vesikelneubildung ausrechterhalten. Der Freisetzungsprozeß selbst wird — wahrscheinlich über Änderungen der intracellulären Calciumkonzentration — vom extracellulären Ionenmilieu, von der Reizfrequenz und der Reizdauer beeinflußt. Verschiedene Reizmuster bei unterschiedlichem Ionenmilieu ermöglichen die gezielte Untersuchung der Größe der einzelnen Reservoirs, der Nachlieferungsgeschwindigkeit sowie der Veränderungen des Freisetzungsprozesses selbst, gemessen am Anteil des Reservoirs an freisetzbaren ACh-Vesikeln, der durch ein AP freigesetzt wird. Diese Parameter können in einer curarefreien, dem Blut etwa isoionalen Ersatzlösung nicht gemessen werden, da die EPP unter diesen Bedingungen überschwellig sind. Ein Einfluß von d-TC auf die Freisetzung von ACh kann in einer solchen Ersatzlösung also nur anhand einer unterschiedlichen Wirkung verschiedener, die neuromuskuläre Übertragung blockierender Curarekonzentrationen ($> 2 \cdot 10^{-6}$ g/ml d-TC) nachgewiesen werden. Da diese Konzentrationen schon im Sättigungsbereich eines möglichen präsynaptischen Curareeffektes liegen könnten, haben wir auch Untersuchungen in einem niedrigeren Konzentrationsbereich ($1—12 \cdot 10^{-7}$ g/ml d-TC) nach Erhöhung der $(Mg^{++})_o$ und Erniedrigung der $(Ca^{++})_o$ durchgeführt.

Doppelreize

Wenn man 2 Reize mit kurzem Intervall auf den motorischen Nerven appliziert, so ist in normaler Krebs-Lösung mit einer die Überleitung blockierenden Curarekonzentration die Amplitude des zweiten EPP in Abhängigkeit vom Intervall meist vermindert (Eccles et al., 1941). Das Minimum liegt meist bei Reizintervallen zwischen 50—200 msec. Die Ursache der Abnahme des zweiten Potentials wird in einer Verminderung

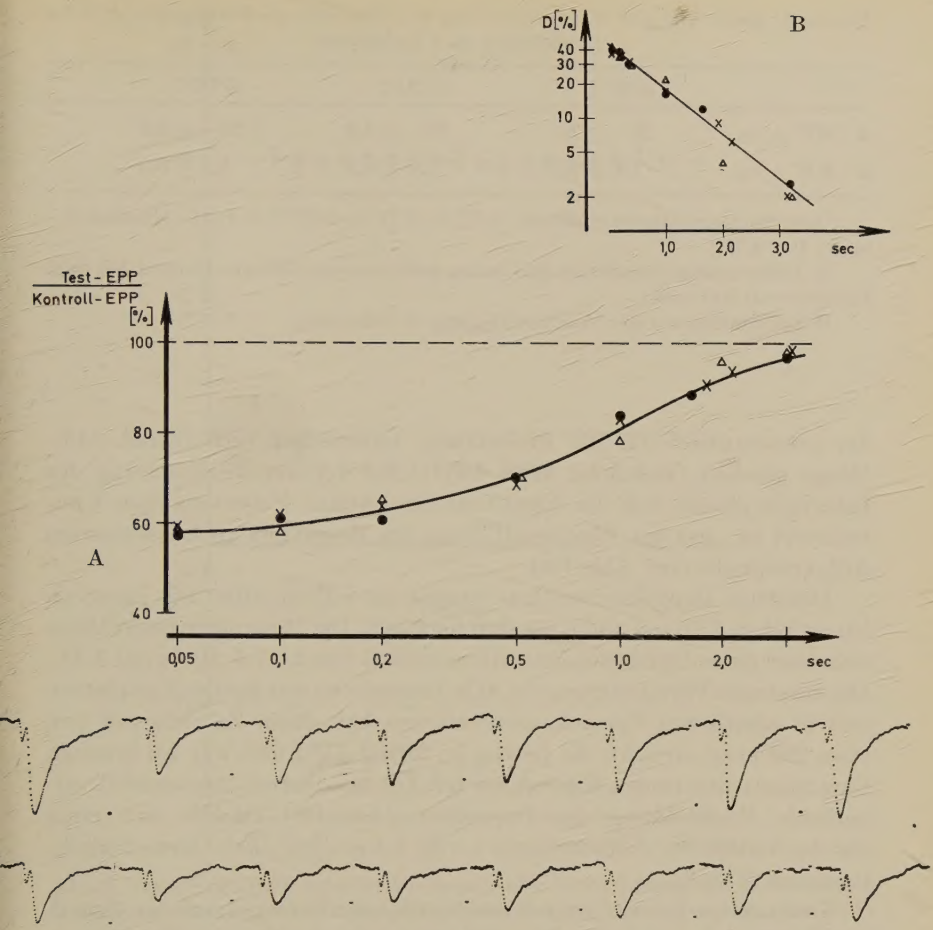

Abb. 1. A EPP-Amplituden bei Doppelreizen in zeitlichen Intervallen von 50 msec bis 3 sec (Einzelversuch). Die Amplitude des zweiten EPP (Test-EPP) ist in Prozent des ersten EPP (Kontroll-EPP) angegeben. Jeder Meßpunkt ist Mittelwert aus 4—8 EPP-Amplituden. Die verschiedenen Symbole stehen für folgende Curarekonzentrationen (g/ml d-TC): $\times = 2{,}5 \cdot 10^{-6}$, $\bullet = 5 \cdot 10^{-6}$, $\triangle = 7{,}5 \cdot 10^{-6}$. B Zur Berechnung der Zeitkonstanten τ (in Sekunden) für die Wiederauffüllung des ACh-Reservoirs an freisetzbarem ACh. Bei annähernd exponentiell verlaufender Nachlieferung in das Reservoir ergibt sich folgender Ansatz:

$$\ln \frac{D}{D_0} = \frac{-t}{\tau} \text{ (vgl. Takeuchi, 1958).}$$

D = Differenz der Amplituden des ersten und zweiten EPP; D_0 = extrapolierter Wert für $t = 0$. Aus der Steigung der resultierenden Geraden wurde τ berechnet. Im unteren Teil Originalregistrierungen (Display des Computer-Oscillographen). 1. Reihe d-TC $2{,}5 \cdot 10^{-6}$ g/ml; 2. Reihe d-TC $5 \cdot 10^{-6}$ g/ml. Links jeweils Kontroll-EPP, darauf folgend Test-EPP in zunehmendem Zeitabstand

Tabelle 2. *Entleerung und Wiederauffüllung des Reservoirs an freisetzbaren ACh bei Doppelreizen an 8 Endplatten*

	d-TC 1	d-TC 2	d-TC 3
A MW $\pm \sigma_M$	29 $\pm$ 2,7	26 $\pm$ 2,9	23 $\pm$ 3,8
B MW $\pm \sigma_M$	1,4 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,3

Curarekonzentrationsverhältnis: d-TC 1: d-TC 2: d-TC 3 = 1:2:3 (Bereich 2 bis $8 \cdot 10^{-6}$ g/ml).

A Differenz der Amplitude des ersten und zweiten EPP (in Prozent bei dem Reizintervall 200 msec).

B Zeitkonstante τ der Wiederauffüllung in Sekunden.

der präsynaptisch für die Freisetzung unmittelbar verfügbaren ACh-Menge gesehen (Takeuchi, 1958, 1961). Bei weiterer Verlängerung des Intervalls gleicht sich die Amplitude des zweiten Potentials dem Kontrollwert an, was der Wiederauffüllung des Reservoirs an freisetzbarem ACh entspricht (vgl. Abb. 1 A).

Derartige Doppelreizversuche wurden an 8 Endplatten mit Intervallen zwischen 15 msec und 3 sec durchgeführt. Die Messungen erstreckten sich über einen Curarekonzentrationsbereich von $2-7{,}5 \cdot 10^{-6}$ g/ml d-TC. Die maximale Verminderung der ACh-Freisetzung war an allen Endplatten und in sämtlichen Curarekonzentrationen bei einem Zeitintervall von etwa 200 msec erreicht. Sie betrug im Mittel 27% und war bei höheren Curarekonzentrationen eher erniedrigt. Die annähernd exponentiell verlaufende Rückbildung der Depression (Abb. 1 B) erfolgte mit einer durchschnittlichen Zeitkonstante τ von 1,4 sec bei allen Curarekonzentrationen (Tab. 2).

Demzufolge haben Curarekonzentrationsänderungen auf den Anteil, der aus dem Reservoir an freisetzbarem ACh durch einen Reiz freigesetzt wird, und auf die Nachlieferungsgeschwindigkeit keinen Einfluß.

Kurze Reizserien

Bei Reizung mit konstanter Frequenz können im Verlauf der Reizserie unterschiedliche Änderungen der EPP-Amplituden, z. B. in Abhängigkeit vom Ionenmilieu, beobachtet werden. In Krebs-Lösung beobachtet man anfänglich eine Abnahme der Amplituden, bis sich nach etwa 6—8 Impulsen ein Plateau einstellt. Dagegen erfahren bei niedriger $(Ca^{++})_o$ und/oder hoher $(Mg^{++})_o$ die Amplituden der EPP im Laufe der Reizserie eine zunehmende Bahnung, die nach etwa 20—40 Reizen (abhängig von der Reizfrequenz) in ein Plateau einmündet. Die postsynaptische Empfindlichkeit für ACh ändert sich während einer kurzen

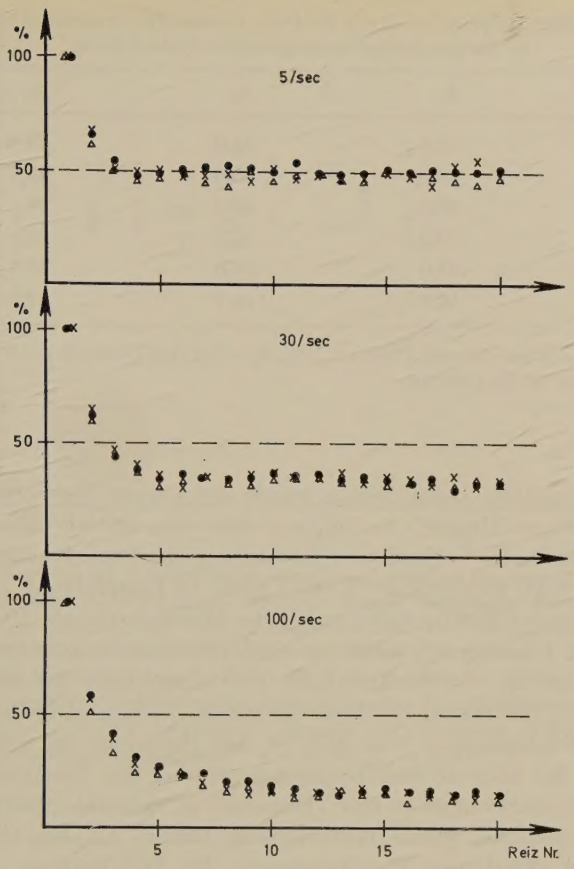

Abb. 2. Verlauf der EPP-Amplituden in normaler Krebs-Lösung mit verschiedenen Curarekonzentrationen bei kurzer frequenter Reizung (Einzelversuch). Die EPP-Amplituden sind in Prozent des ersten EPP fortlaufend über der Reizzahl aufgetragen. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert aus 4 Reizserien. Curarekonzentrationen (g/ml d-TC): $\times = 4 \cdot 10^{-6}$, $\bullet = 6 \cdot 10^{-6}$, $\triangle = 8 \cdot 10^{-6}$

Reizserie nicht (Otsuka u. Nonomura, 1962), so daß die Änderungen der EPP-Amplituden durch eine Änderung der Freisetzung bedingt sind.

Präsynaptisch wirksame Pharmaka, z.B. Tetraäthylammonium (Stovner, 1957; Koketsu, 1958) und Guanidin (Otsuka u. Endo, 1960), beeinflussen ebenfalls die relative Plateauhöhe, bezogen auf das erste EPP der Reizserie. Aus diesem Grunde haben wir den Einfluß von Curare auf den Verlauf der EPP-Amplitude bei kurzen Reizserien unterschiedlicher Frequenz untersucht.

Tabelle 3. *Mittlere Amplitude (A) der EPP im Plateau (in Prozent des ersten EPP), bei kurzen Reizserien in normaler Krebs-Lösung*

Frequenz/sec	A_1	A_2	A_3
5	55,4	51,0	58,6
10	49,0	48,3	47,7
25	50,0	45,0	51,1
30	39,0	35,5	34,0
50	43,0	38,0	45,7
100	19,7	19,7	19,3

Curarekonzentrationsverhältnis: $A_1 : A_2 : A_3 = 1 : 1{,}5 : 2$ (Bereich $2-8 \cdot 10^{-6}$ g/ml). Mittelwerte von 10 Endplatten.

In blutisoionaler Ersatzlösung wurde bei kurzen Reizserien (20 bis 40 Reize, Frequenzbereich 5—100/sec) stets eine initiale Abnahme der EPP-Amplituden im Verlauf einer Reizserie beobachtet (Konzentrationsbereich von d-TC zwischen $2-8 \cdot 10^{-6}$ g/ml, 10 Endplatten).

Mit steigender Reizfrequenz nahm die Plateauhöhe ab. In dem Versuch in Abb. 2 betrug bei allen verwendeten Curarekonzentrationen in gleicher Weise die durchschnittliche EPP-Amplitude im Plateau bei 5/sec ca. 50% des ersten EPP, bei 30/sec ca. 35% und bei 100/sec ca. 20%. Die Nachlieferung von ACh in das Reservoir an freisetzbaren Vesikeln ist bei höherer Reizfrequenz gegenüber der Nachlieferung bei Doppelreizen stark beschleunigt (Elmqvist u. Quastel, 1965), was als Mobilisation gedeutet wurde (Kruckenberg, 1968a). An allen 10 Endplatten war bei sämtlichen Reizfrequenzen die Mobilisation von ACh-Vesikeln unabhängig von der Curarekonzentration (Tab. 3).

Im Bereich niedriger $(Ca^{++})_o$ bzw. hoher $(Mg^{++})_o$ (d.h. bei präsynaptischer Hemmung) nehmen die Amplituden der EPP im Laufe einer Reizserie zu, wobei vorwiegend der Freisetzungsprozeß selbst gebahnt ist (Del Castillo u. Katz, 1954). Bei $(Ca^{++})_o$ zwischen 0,8 und 2 mM/l und $(Mg^{++})_o$ zwischen 2 und 3 mM/l konnte der Einfluß von d-TC-Konzentrationsänderungen im Bereich niedrigerer Konzentrationen $(0{,}1-1{,}2 \cdot 10^{-6}$ g/ml) untersucht werden.

Bei Frequenzen unterhalb von 10/sec blieb die mittlere EPP-Amplitude im Verlauf einer Reizserie konstant. Bei Frequenzen von 50/sec und 100/sec war stets eine mit der Reizfrequenz zunehmende Bahnung der EPP-Amplituden erkennbar. Das Ausmaß der Bahnung, gemessen an der EPP-Amplitude im Plateau in Prozent des Ausgangswertes, war unabhängig von der Curarekonzentration (6 Endplatten, Einzelversuch in Abb. 3).

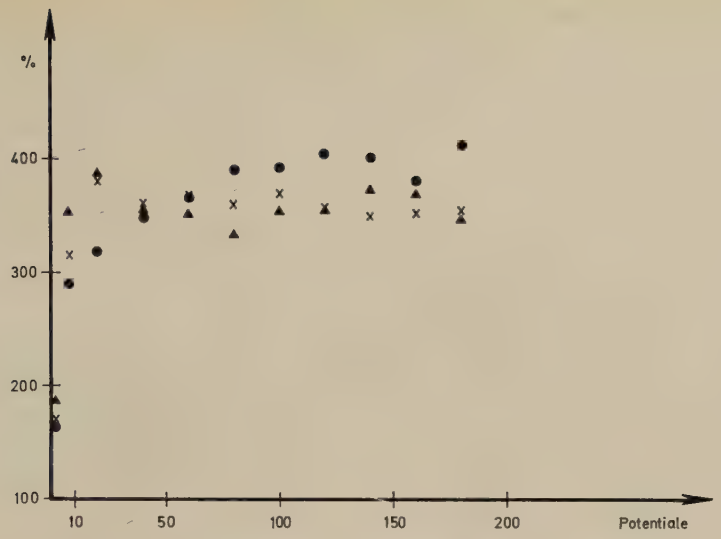

Abb. 3. Verlauf der EPP-Amplituden bei präsynaptischer Hemmung durch $(Ca^{++})_o$ = 1,2 mM/l, $(Mg^{++})_o$ = 2,4 mM/l, während kurzer frequenter Reizung bei einer Frequenz von 100/sec. Die EPP-Amplituden sind in Prozent des ersten EPP (Mittelwert aus 8—15 Einzelreizen) über der Reizzahl aufgetragen. Der erste Meßpunkt ist der Mittelwert aus der 2.—4. EPP-Amplitude, der zweite der Mittelwert aus der 5.—10. EPP-Amplitude, die darauffolgenden Meßpunkte stellen den Mittelwert aus jeweils 20 EPP-Amplituden dar. Die verschiedenen Symbole stehen für folgende Curarekonzentrationen: $\bullet = 6 \cdot 10^{-7}$, $\blacktriangle = 10 \cdot 10^{-7}$, $\times = 12 \cdot 10^{-7}$ g/ml d-TC

Die Amplitude des unit potential bei verschiedenen Reizfrequenzen

Die durch ein AP freigesetzte ACh-Menge hängt sowohl von der Zahl der ACh-Quanten als auch von der einem ACh-Quant entsprechenden Zahl von ACh-Molekülen ab. Nach Elmqvist u. Quastel (1965) ist bei frequenter Reizung der motorischen Nerven die ACh-Menge pro Quant unabhängig von der Reizfrequenz. Wir haben diese Befunde nachgeprüft: Aus der Streuung der EPP-Amplituden im Bereich des Plateaus bei kurzen Reizserien unterschiedlicher Frequenz wurde die Quantenzahl und die mittlere Depolarisationsamplitude des Einzelquants (unit potential q) berechnet.

Für jede Konzentration von d-TC wurde dann der Wert von q bei einer bestimmten Frequenz durch den Mittelwert sämtlicher q bei den verschiedenen Frequenzen dividiert und so ein relatives Maß gewonnen, mit dessen Hilfe die Ergebnisse hinsichtlich eines Einflusses der Reiz-

Tabelle 4. *Abhängigkeit der Amplitude des unit potential q von der Frequenz (in relativen Einheiten)*

Frequenz i (i/sec)		0,2	1	5	10	25	30	50	100
A	$\bar{q}(i)$	—	—	1,00	1,03	0,97	1,00	1,01	1,14
B	$\bar{q}(i)$	0,98	1,03	0,99	—	—	—	1,04	0,99

A Etwa blutisoionale Ersatzlösung: $(Ca^{++})_o = 2{,}54$ mM/l, $(Mg^{++})_o = 1{,}1$ mM/l (d-TC: $2-8 \cdot 10^{-6}$ g/ml, 8 Endpl.).

B Bei präsynaptischer Hemmung: $(Ca^{++})_o = 0{,}8-2$ mM/l, $(Mg^{++})_o = 2-3$ mM/l. (d-TC: $0{,}8-1{,}2 \cdot 10^{-6}$ g/ml, 3 Endpl.).

Zur Berechnung der absoluten Werte der Amplitude des unit potential $q(i)$ bei der Frequenz i wurden aus mehreren kurzen Reizserien jeweils die Amplituden des 10.—40. EPP (bei A), bzw. des 40.—100. EPP (bei B) benutzt. Die Werte für $q(i)$ lagen zwischen 4 und 21 μV (A), bzw. zwischen 26 und 78 μV (B). Danach wurde bei jeder d-TC-Konzentration der Mittelwert q_M aller $q(i)$ gebildet und $q(i)_{rel} = q(i)/q_M$ berechnet. Die so an mehreren Endplatten jeweils für verschiedene d-TC-Konzentrationen erhaltenen relativen Werte $q(i)_{rel}$ wurden nochmals gemittelt, der MW als $\bar{q}(i)$ bezeichnet.

frequenzen auf die Amplitude des unit potential bei verschiedenen Curarekonzentrationen und mehreren Endplatten zusammengefaßt werden konnten (Tab. 4).

Danach besteht eine Abhängigkeit des unit potential von der Reizfrequenz weder in normaler Krebs-Lösung (A) noch bei erniedrigter $(Ca^{++})_o$ und erhöhter $(Mg^{++})_o$ (B). Die geringe Erhöhung der Amplitude bei 100/sec in normaler $(Ca^{++})_o$ und $(Mg^{++})_o$ dürfte darauf beruhen, daß wegen der niedrigen EPP-Amplituden im Bereich des ersten Plateaus die Streuung nicht nur durch die Quantelung des Freisetzungsprozesses, sondern z.T. auch durch das Rauschen in der Registrieranordnung bedingt ist.

Wenn bei Reizserien unterschiedlicher Frequenz die Amplitude des unit potential im Bereich des Plateau konstant ist, müssen Änderungen der EPP-Amplitude auf Änderungen der Zahl der freigesetzten Quanten zurückgeführt werden.

Die Quantenzahl bei verschiedenen Curarekonzentrationen

In Tab. 5 sind die mittleren Quantenzahlen pro EPP bei Einzelreizen und im Bereich des Plateaus von kurzen Reizserien unterschiedlicher Frequenz für verschiedene Curarekonzentrationen an 6 Endplatten aufgeführt. Bei normaler $(Ca^{++})_o$ und $(Mg^{++})_o$ (Tab. 5 A) lag die initiale ACh-Freisetzung zwischen 260 und 412 Quanten pro EPP. Die Quantenzahl im Bereich des Plateaus nahm mit Erhöhung der Reizfrequenz ab (Brooks u. Thies, 1962; Elmqvist et al., 1964).

Tabelle 5. *Die Zahl der freigesetzten Quanten pro Einzelreiz (m_i) und im Plateau kurzer Reizserien ($\bar{m}$)*

A		m_i	$\bar{m}$					
Endplatten Nr.			(Freq./sec)					
			5	10	25	30	50	100
1	d-TC 1	269	120	117		93		
	d-TC 2	319	154	145		115		
	d-TC 3	276	132	126		91		
2	d-TC 1	244	113	123	110		87	51
	d-TC 2	262	124	121	104		87	51
	d-TC 3	248	113	102	86		65	35
3	d-TC 1	391	281		288		257	
	d-TC 2	412	276		275		237	
4	d-TC 1	260	133		128		111	
	d-TC 2	262	137		126		127	

B		$\bar{m}$				
Endplatten Nr.		(Freq./sec)				
		0,2	1	5	50	100
5	d-TC 1	85	68	70		100
	d-TC 2	85	67	53		104
6	d-TC 1	6,1	5,8	6,8	22,1	18,2
	d-TC 2	6,2	6,5	7,0	20,4	18,2
	d-TC 3	4,2	4,8	5,2	18,4	21,3
	d-TC 4	5,7	6,3	7,2	23,4	19,5
	d-TC 5	8,0	7,1	6,3	14,8	

A Normale $(Ca^{++})_o$, $(Mg^{++})_o$.

B Präsynaptische Hemmung durch $(Mg^{++})_o$ 3 mM/l und $Ca^{++})_o$ 2 mM/l (Endpl. 5) bzw. 1,5 mM/l (Endpl. 6). m_i wurde ermittelt durch Division der mittleren EPP-Amplitude von Einzelreizen durch die mittlere Amplitude des unit potential $\bar{q}$, m durch Division der mittleren EPP-Amplitude (30 EPP) im Plateau einer Reizserie durch $\bar{q}$ für jede Curarekonzentration. Die Quantenzahl $\bar{m}$ stellt ein Mittel von m aus mindestens 4 Reizserien dar.

Die Curarekonzentrationsverhältnisse betrugen:
Endpl. 1 u. 2: TC 1 : TC 2 : TC 3 = 1 : 1,5 : 2;
Endpl. 3—5: TC 1 : TC 2 = 1 : 2;
Endpl. 6: TC 1 : TC 2 : TC 3 : TC 4 : TC 5 = 1 : 1,5 : 2 : 2,5 : 3.

Konzentrationsbereich von d-TC:
Endpl. 1—4: $2—8 \cdot 10^{-6}$ g/ml;
Endpl. 5 u. 6: $0{,}4—1{,}2 \cdot 10^{-6}$ g/ml.

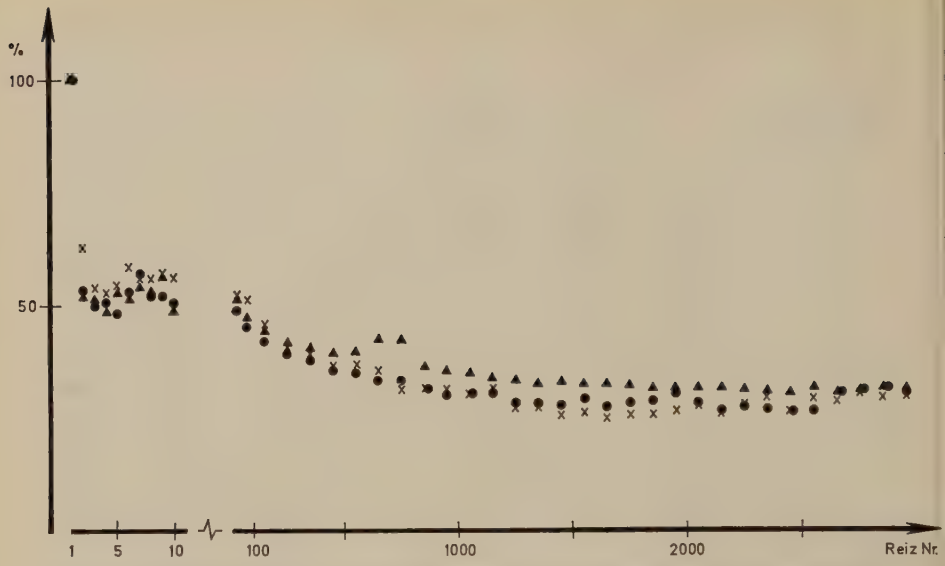

Abb. 4. Verlauf der EPP-Amplituden während langer Reizserien in normaler Krebs-Lösung $(Ca^{++})_0$. Die Reizfrequenz betrug 25/sec. Die EPP-Amplituden sind in Prozent des ersten EPP (Mittelwert aus mindestens 50 Kontrollwerten) fortlaufend über der Reizzahl aufgetragen. Dabei wurden nach dem 10. Reiz einmal 40, einmal 50 und im weiteren Verlauf jeweils 100 Amplituden gemittelt. Bei den Konzentrationen $2{,}5 \cdot 10^{-6}$ (×) und bei $5 \cdot 10^{-6}$ (•) g/ml d-TC entsprechen die Meßpunkte den Mittelwerten von 2 Reizserien, bei $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ g/ml d-TC (▲) einer Reizserie. Die Pausen zwischen den Serien betrugen 30 min

Bei erniedrigter $(Ca^{++})_0$ und erhöhter $(Mg^{++})_0$ (Tab. 5B) betrug die initiale Freisetzung 8—92 Quanten pro EPP. Höhere Frequenzen bewirkten eine erhebliche Bahnung (Del Castillo u. Katz, 1954; Braun et al., 1966). Daraus geht hervor, daß Änderungen der Curarekonzentration über die Bereiche von $0{,}4—1{,}2 \cdot 10^{-6}$ und $2—8 \cdot 10^{-6}$ g/ml d-TC die Zahl der freigesetzten Quanten bei Einzelreizung und kurzen Reizserien nicht beeinflussen.

Aus der pro Einzelreiz freigesetzten Zahl von ACh-Quanten und dem maximalen Wert für die prozentuale Differenz zwischen der Amplitude des ersten und zweiten EPP (D_0, vgl. Abb. 2) läßt sich die im Reservoir an freisetzbarem ACh enthaltene Quantenzahl ermitteln. An 4 Endplatten enthielt das Reservoir 960 ± 170 Quanten.

Lange Reizserien

Bei länger dauernder frequenter Reizung (2000—6000 Reize) in etwa blutisoionaler Badflüssigkeit bleibt das sich primär ausbildende Plateau

Tabelle 6. *Höhe des zweiten Plateaus der EPP-Amplituden bei längerer frequenter Reizung (25/sec in normaler Krebs-Lösung), angegeben in Prozent des ersten EPP (Mittelwert aus 50—100 Einzelreizen). Der angegebene Wert ist das Mittel aus 500 EPP-Amplituden zwischen dem 750. und 1250. Reiz*

Endplatten Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
A_1	20,5	23,5	34,1	50,3	30,4	28,3	36,4	55,0
A_2	24,1	28,2						
A_3	17,7	22,4	28,8	56,5	30,1	31,6	39,6	
A_4					35,0			61,8

Curarekonzentrationsverhältnisse:
$A_1 : A_2 : A_3 : A_4 = 1 : 1{,}5 : 2 : 3$ (Bereich $2-8 \cdot 10^{-6}$ g/ml d-TC).

der EPP-Amplituden nicht konstant, sondern es zeigt sich ein weiterer sehr langsamer Abfall, der meist in ein zweites Plateau einmündet. Dieses zweite Plateau dürfte durch eine Gleichgewichtseinstellung zwischen der Entleerung des ACh-Speichers und der Nachlieferung durch Synthese zustande kommen (Elmqvist u. Quastel, 1965; Kuckenberg, 1968a).

An 8 Endplatten wurden Reizserien von ca. 3000 Reizen (Frequenz 25/sec) bei verschiedenen Curarekonzentrationen gegeben. Die Höhe des Plateaus der EPP-Amplituden beim 1000. Reiz (d.h. nach 40 sec) an verschiedenen Endplatten lag im Mittel bei etwa 34% des ersten EPP (Abb. 4, Tab. 6).

Die Auswertung hinsichtlich Quantenzahl und Amplitude des unit potential ergab, daß auch bei langen Reizserien die Verminderung der EPP-Amplituden auf eine Abnahme der Quantenzahl pro Reiz zurückgeführt werden muß (Abb. 5). Bei 3 Endplatten lag die Quantenzahl beim ersten Reiz im Mittel bei 380 ± 103, nach 1000 Reizen bei 175 ± 38 und nach 3000 Reizen bei 178 ± 40.

Bei Experimenten mit erhöhter $(Mg^{++})_o$ und verminderter $(Ca^{++})_o$ bleibt das sich nach anfänglicher Bahnung der EPP-Amplituden einstellende Plateau auch bei längerer Reizung (25/sec, 5000 Reize) meist konstant. In einem Teil der Experimente nahm die Amplitude im weiteren Verlauf noch allmählich zu oder geringfügig ab, doch stellt sich auch hier nach mehr als ca. 1000 Reizen ein stabiles zweites Plateau ein.

Bei 2 Versuchen kam es nach unterschiedlicher Reizdauer (mehr als 2000 Reize) innerhalb weniger Sekunden zu einer starken Abnahme der EPP-Amplitude, die auf eine Verminderung der Zahl der freigesetzten Quanten zurückzuführen ist (Abb. 6). Der Zeitpunkt des Abfalls der Quantenzahl war weder von der Curarekonzentration noch von der Versuchsdauer abhängig. In dem Experiment der Abb. 6 wurde bei den

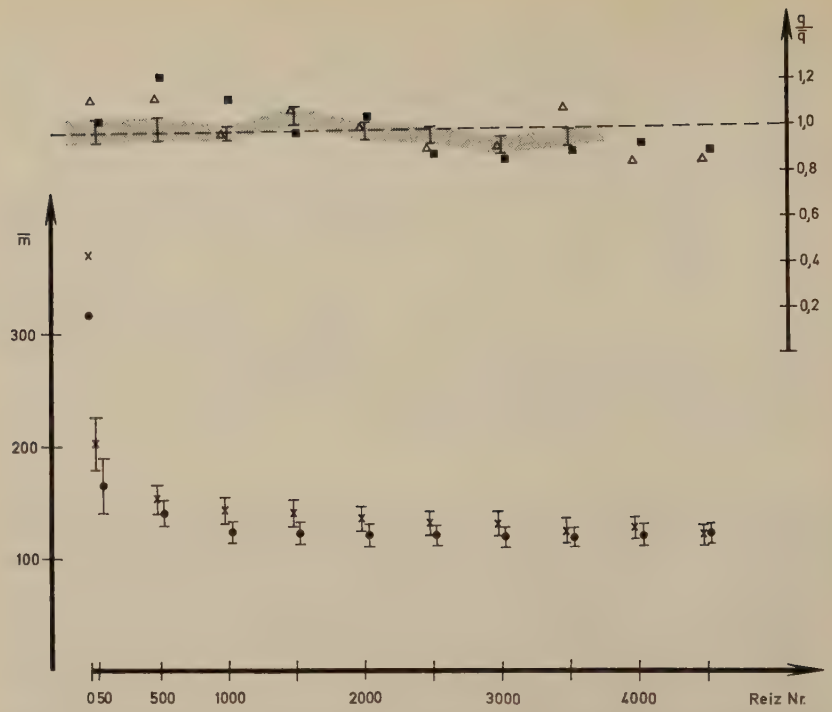

Abb. 5. Abhängigkeit der mittleren Quantenzahl $\overline{m}$ von der Curarekonzentration während längerer frequenter Reizung (25/sec), normale Krebs-Lösung. Die ersten Meßpunkte wurden durch Division der mittleren Amplitude von 50 Kontroll-EPP durch die mittlere Amplitude des unit potential $\overline{q}$ ermittelt. Die weiteren Werte wurden aus der Berechnung des Variationskoeffizienten von $2 \cdot 25$ Amplituden (m_{50}), bzw. $5 \cdot 100$ Amplituden (übrige Meßpunkte) gewonnen, der mittlere Fehler wurde gemäß $\sigma_M = \frac{m}{\sqrt{N}} \sqrt{4\,(CV)^2 + 2}$ (vgl. Martin, 1966) berechnet. Im oberen Teil der Abbildung wird gezeigt, daß das unit potential q (angegeben in Relativwerten) während längerer Reizung annähernd konstant bleibt. Die verschiedenen Symbole haben folgende Bedeutung: $\times$, $\triangle = 2{,}5 \cdot 10^{-6}$, $\bullet$, $\blacksquare = 5 \cdot 10^{-6}$ g/ml d-TC (Einzelversuch); I = Mittelwert $\pm\, \sigma_M$ für $q/\overline{q}$ von 11 Endplatten (31 Reizserien)

Curarekonzentrationen 4, 6, 8 und $10 \cdot 10^{-7}$ g/ml d-TC an einer Endplatte abgeleitet. Die Pausen zwischen den Reizserien betrugen 30 min. Bei den Curarekonzentrationen 6 bzw. $8 \cdot 10^{-7}$ g/ml trat der Abfall der Quantenzahl je 1 mal vor Ende der Reizserie ein, während das andere Mal nach 5—6000 Reizen das Plateau noch völlig erhalten war. Weiterhin fällt auf, daß die Freisetzung während der ersten 1000 Reize von dem Verhalten während der vorangegangenen Serie nicht beeinflußt wurde (vgl. 3., 4. und 5. Reizserie).

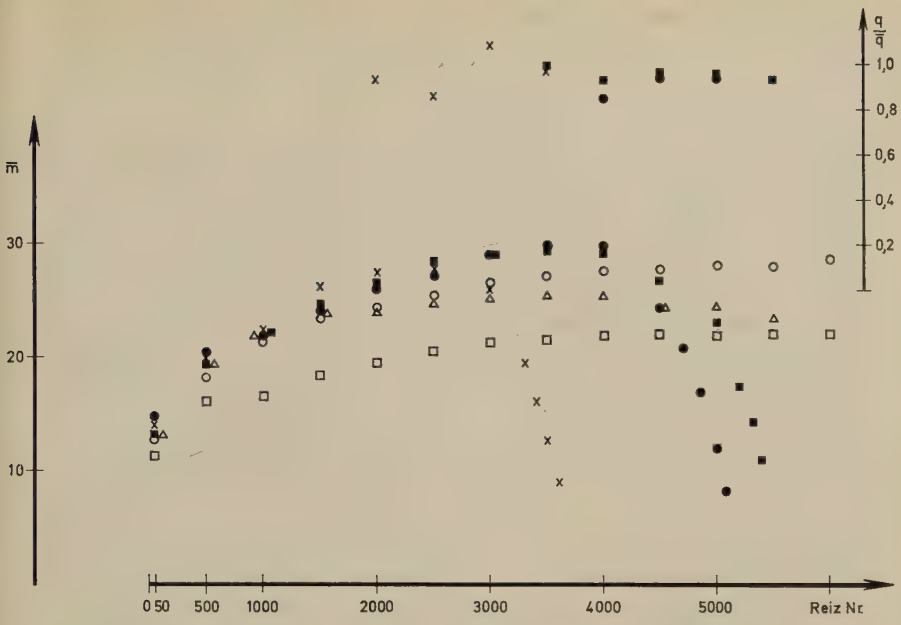

Abb. 6. Verlauf der Quantenzahl pro Reiz während langdauernder frequenter Reizung (20/sec), bei präsynaptischer Hemmung $(Ca^{++})_o = 1{,}5$ mM/l, $(Mg^{++})_o = 3$ mM/l. Die Quantenzahl wurde mittels Division der EPP-Amplitude (Mittelwert von 40—500 Potentialen) durch $\bar{q}$ berechnet. Reihenfolge der Reizserien und Bedeutung der Symbole:

1. □ = $8 \cdot 10^{-7}$ 2. ○ = $6 \cdot 10^{-7}$ 3. ■ = $8 \cdot 10^{-7}$
4. △ = $10 \cdot 10^{-7}$ 5. ● = $6 \cdot 10^{-7}$ 6. × = $4 \cdot 10^{-7}$ g/ml d-TC.

Beachte die plötzliche Abnahme der Quantenzahl bei der 3., 5. und 6. Reizserie. Das unit potential q (im oberen Teil der Abbildung in relativen Einheiten angegeben) bleibt jedoch in diesem Bereich (entsprechende Symbole) konstant

Die Ursache für die vorübergehende Blockierung der ACh-Freisetzung kann nur mit gleichzeitiger Ableitung des Aktionspotentials der motorischen Nervenendigung geklärt werden. Das ziemlich plötzliche Eintreten spricht gegen eine Entleerung des ACh-Speichers und eher für einen Leitungsblock in den terminalen Aufzweigungen des Axons. Die entsprechenden Quantenzahlen nach Änderung der Curarekonzentration lagen im Streubereich.

Die Abnahme der Quantenzahl vom ersten auf das zweite Plateau verläuft annähernd exponentiell. Mit den Annahmen, daß erstens die Freisetzung pro Reiz zwischen dem ersten und zweiten Plateau proportional dem jeweiligen Speicherinhalt ist und zweitens die Syntheserate proportional der Verminderung des Vesikelinhalts im Spei-

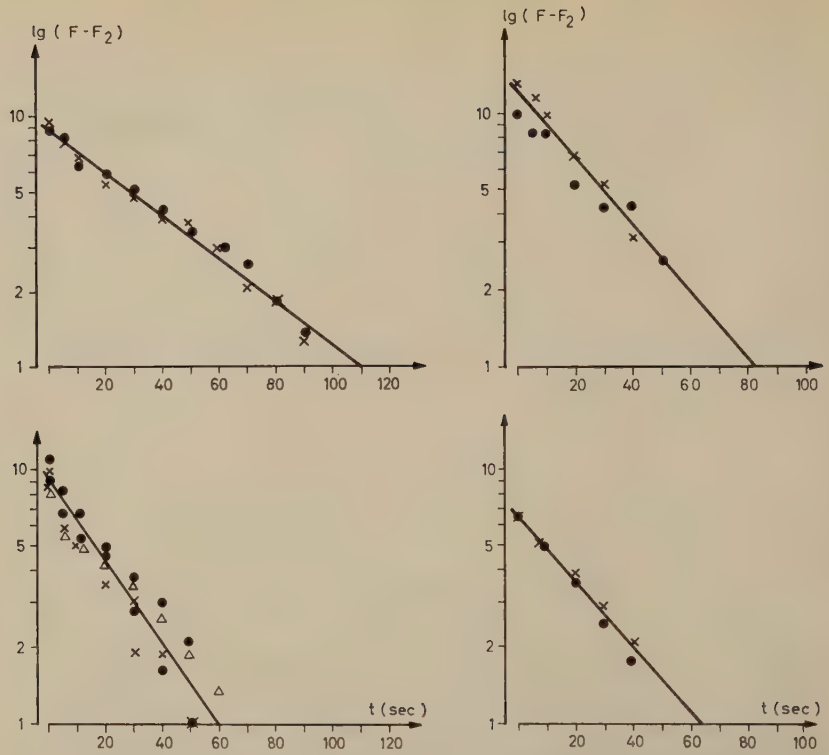

Abb. 7. Berechnung des Speicherinhalts von ACh und des Geschwindigkeitskoeffizienten für die ACh-Nachlieferung in den Speicher (4 Einzelversuche). Aus dem Ansatz

$$\frac{dc}{dt} = -\alpha \cdot c + \beta \cdot (c_1 - c) \text{ und } F = \text{const.} \cdot c.$$

(c = „Vesikelinhalt" im Speicher, c_1 = Inhalt zur Zeit des 1. Plateaus; α, β = Geschwindigkeitskoeffizienten; F = Freisetzung in Quanten/min) folgt:

$$\ln (F - F_2) = \ln (F_1 - F_2) - (\alpha + \beta)\, t = \frac{F_2}{F_1} \quad (\alpha + \beta);\ c_1 = \frac{F_1}{\alpha}$$

(F_1, F_2 = Freisetzung in Quanten/min zum Zeitpunkt des 1. bzw. 2. Plateuas.) Aufgetragen wurde $F - F_2$ (relative Einheiten) im semilogarythmischen Raster über die Zeit. Aus der Steigung der resultierenden Geraden wurden dann α, β, c_1 und schließlich F_1 berechnet. Die Symbole entsprechen jeweils verschiedenen Curarekonzentrationen im Konzentrationsbereich $2-8 \cdot 10^{-6}$ g/ml d-TC

cher (vgl. Elmqvist u. Quastel, 1965; Kruckenberg, 1968a), ergeben sich für den Speicherinhalt bei Reizbeginn 340000 ± 77000 Quanten (4 Endplatten), für den Geschwindigkeitskoeffizienten der Nachlieferung β = 1,3 ± 0,56 min^{-1} (Abb. 7, Berechnung s. Legende). Aus der Abbildung wird deutlich, daß sowohl der Speicherinhalt wie auch der Geschwindigkeits-

koeffizient β bei teilweise über 2 Std dauernden Versuchen und bei verschiedenen Curarekonzentrationen konstant bleiben.

Diskussion

Von den meisten Autoren wurde bisher die Frage eines Einflusses von Curare auf die ACh-Freisetzung mit Modifikationen der schon von Dale, Feldberg u. Vogt (1936) angewandten Methode — biologischer Nachweis des in die Badflüssigkeit freigesetzten ACh — untersucht. Diese Methode erlaubt zwar eine absolute Messung der pro Zeiteinheit freigesetzten ACh-Menge und kann auch ohne neuromuskulären Block angewandt werden; sie hat jedoch eine Reihe von Fehlermöglichkeiten. Zunächst ist eine vollständige Hemmung der Cholinesterasen notwendig. So wird von Chang, Cheng u. Chen (1967) angenommen, daß in den Versuchen von Beani, Bianchi u. Ledda (1961a und b; 1964), die als einzige mit dieser Methode eine Hemmung der ACh-Freisetzung durch Curare gefunden haben, eine teilweise Reaktivierung der Cholinesterasen von wesentlicher Bedeutung war. Die Hemmung der Cholinesterasen könnte, besonders im curarefreien Medium, einen direkten oder indirekten Einfluß auf die ACh-Freisetzung haben. Unter diesen Bedingungen kann nämlich nach orthodromer Reizung des motorischen Nerven häufig ein antidromes Aktionspotential abgeleitet werden, d.h. ein Reiz kann 2 oder mehrere Aktionspotentiale in der Nervenendigung bewirken (vgl. Riker et al., 1959a und b; Standaert u. Riker, 1967; Katz, 1962). Weiterhin führt eine ausgeprägte postsynaptische Depolarisation, wie sie in curarefreier Lösung bei Hemmung der ACh-Hydrolyse auftritt, zu einem verstärkten K^+-Ausstrom aus den Muskelfasern. Eine erhöhte extracelluläre K^+-Konzentration steigert jedoch die ACh-Freisetzung (Takeuchi, 1961).

Der wesentliche Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, daß große Reizzahlen notwendig sind, um eine für den biologischen Test ausreichende ACh-Konzentration zu erreichen. Besonders bei Reizfrequenzen von mehr als 10/sec kommt es im Verlauf längerer Reizserien zu Leitungsstörungen in den muskelnahen Nervenabschnitten (Krnjević u. Miledi, 1959), die einen wesentlichen Einfluß auf die in die Badlösung freigesetzte ACh-Menge haben könnten. Dabei ist zu beachten, daß ACh sowie einige Anticholinesterasen eine Schwellenerniedrigung der motorischen Nervenendigung bewirken, die durch Curare beeinflußt wird (Hubbard et al., 1965).

Änderungen der ACh-Freisetzung im Verlauf einer Reizserie können mit der Methode von Dale et al. nicht erfaßt werden, ein Nachteil, der besonders von Lilleheil u. Naess hervorgehoben wurde, die nach Experimenten mit extracellulären Massenableitungen die sog. Wedensky-Hemmung als Curareeffekt beschrieben (Lilleheil u. Naess, 1960, 1961; Naess, 1952, 1953).

Tabelle 7

R (Quanten)	S (Quanten)	τ (sec)	β (min^{-1})	Präparat	Literatur
		4,4—5,8		Frosch Sartorius	Takeuchi (1958)
375	23000			Mensch Intercostal-muskel	Thies (1965)
ca. 1000		ca. 2—3		Meer-schweinchen Sartorius	Elmqvist u. Quastel (1965)
960 ± 170	340000 ± 77000	$1,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,56$	Gold-hamster Zwerchfell	diese Arbeit

Sie stützen sich dabei vor allem auf Ableitungen bei allmählich zunehmender Curarisierung und beim Auswaschen von Curare mit Ringer-Lösung. Gerade unter diesen Versuchsbedingungen ist die Anwendung extracellulärer Massenableitungen sehr problematisch, da das Summenendplattenpotential durch Aktionspotentiale in einem kleinen Teil der Fasern erheblich verändert wird.

Wir haben bei ähnlichen Auswaschexperimenten mit intracellulären Ableitungen niemals eine signifikante Änderung der Quantenzahl pro Reiz gefunden (unveröffentlichte Beobachtung). Die in dieser Arbeit angewandte Methode der intracellulären Ableitung von Endplattenpotentialen erlaubt hingegen einen schnellen und genauen Nachweis des freigesetzten ACh. Sie ermöglicht vor allem die Bestimmung sowohl der pro Reiz freigesetzten Zahl der ACh-Quanten als auch der Depolarisationswirkung des Einzelquants (unit potential).

Wir konnten in Übereinstimmung mit Elmqvist u. Quastel (1965) nachweisen, daß die Amplitude des unit potential bei verschiedenen Reizfrequenzen und auch bei hohen Reizzahlen konstant bleibt. Die ACh-Menge pro Quant wird nicht von Curare beeinflußt, da die Depolarisationswirkung von in sog. „bursts" freigesetzten Quanten durch Curare in gleichem Maße vermindert wird, wie die durch Mikroelektrophorese bewirkten ACh-Potentiale (Del Castillo u. Katz, 1957b).

Tab. 7 gibt eine vergleichende Übersicht über einige für die ACh-Freisetzung hinsichtlich der Quantenzahl wichtige Parameter: Die Zahlen der Quanten (Vesikel) im Reversoir (R) an freisetzbarem ACh und im Speicher S, die Zeitkonstante τ der ACh-Nachlieferung in das Reservoir aus dem Speicher (bei Doppelreizversuchen) und den Geschwindigkeitskoeffizienten β für die Nachlieferung in den Speicher.

Alle diese Größen wurden ebenso wie die Freisetzung pro Einzelreiz und die bei frequenter Reizung auftretende Depression durch Curarekonzentrationsänderungen im Bereich von $2-8 \cdot 10^{-6}$ g/ml nicht beeinflußt. Auch bei niedrigeren d-TC-Konzentrationen ($0{,}2-1{,}2 \cdot 10^{-6}$ g/ml) war nach Erniedrigung der $(Ca^{++})_o$ und Erhöhung der $(Mg^{++})_o$ die Freisetzung pro Einzelreiz, wie die unter diesen Bedingungen auftretende Bahnung der Freisetzung bei frequenter Reizung, unabhängig von der d-TC-Konzentration.

Die Anwendung noch niedrigerer Curarekonzentrationen sowie ein Vergleich mit curarefreien Badlösungen wurde in dieser Arbeit nur bei Untersuchungen der Rate der MEPP durchgeführt. Der hier ebenfalls negative Befund stimmt mit den Ergebnissen am Froschmuskel (Del Castillo u. Katz, 1957a) überein und wird ergänzt durch Untersuchungen von Beránek u. Vyskočil (1967), die im starken Mg^{++}-Block keine Änderung der Zahl der pro EPP freigesetzten Quanten im Bereich von $1-6 \cdot 10^{-8}$ g/ml d-TC gegenüber curarefreier Lösung beobachten konnten.

Ich spreche meinen besonderen Dank Herrn Prof. Dr. O. H. Gauer für die großzügige Förderung dieser Arbeit aus.

Mein Dank gilt auch Frl. J. Nöring für die sorgfältige technische Assistenz, Herrn Dr. R. Sandweg und Herrn Dr. P. Kruckenberg für die Mithilfe bei einigen Versuchen und für die kritische Beurteilung sowie Herrn Prof. Dr. O. J. Grüsser für die Rechenzeit am Linc 8 (mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft).

Literatur

Abdon, N.-O., Bjarke, T.: The mechanism of acetylcholine liberation in striped muscles. Acta pharmacol. (Kbh.) **1**, 1—17 (1945).

Bauer, H., Kruckenberg, P.: Die präsynaptische Wirkung von d-Tubocurarin an der motorischen Endplatte. Pflügers Arch. ges. Physiol. **297**, 23 (1967).

Beani, L., Bianchi, C.: L'interferenza della d-tubocurarina sulla liberazione di acetilcolina dal preparato frenicodiaframma di cavia. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **37**, 504—507 (1961a).

— — L'interferenza della d-tubocurarina sulla liberazione dalla giunzione neuromuscolare: effetto della temperatura e della frequenza di stimolazione. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **37**, 1150—1153 (1961b).

— — Ledda, F.: The effect of tubocurarine on acetylcholine release from motor nerve terminals. J. Physiol. (Lond.) **174**, 172—183 (1964).

Beránek, R., Vyskočil, F.: The action of tubocurarine and atropine on the normal and denervated rat diaphragma. J. Physiol. (Lond.) **188**, 53—66 (1967).

Birks, R., Mac Intosh, F. C.: Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. Canad. J. Biochem. **39** ,787—827 (1961).

Braun, M., Schmidt, R. F., Zimmermann, M.: Facilitaiton at the frog neuromuscular junction during and after repetitive stimulation. Pflügers Arch. ges. Physiol. **287**, 41—55 (1966).

Brooks, V. B., Thies, R. E.: Reduction of quantum content during neuromuscular transmission. J. Physiol. (Lond.) **162**, 298—310 (1962).

Brown, G. L., Dale, H. H., Feldberg, W.: Reaction of the normal mammalian muscle to acetylcholine and eserine. J. Physiol. (Lond.) **87**, 394—424 (1936).

Chang, C. C., Cheng, H. C., Chen, T. F.: Does d-tubocurarine inhibit the release of acetylcholine from motor nerve endings? Jap. J. Physiol. **17**, 505—515 (1967).

Cheymol, J., Bourillet, F., Ogura, Y.: Action de quelques paralysants neuromusculaires sur la liberation de l'acetylcholine au niveau des terminaisons nerveuses motrices. Arch. int. Pharmacodyn **139**, 187—197 (1962).

Dale, H. H.: Pharmacology and nerve endings. Proc. roy. Soc. Med. **28**, 319—32 (1935a).

— Feldberg, W., Vogt, M.: Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. J. Physiol. (Lond.) **86**, 353—380 (1936).

Del Castillo, J., Katz, B.: Quantal components of the endplate potential. J. Physiol. (Lond.) **124**, 560—573 (1954).

— — A study of curare action with an electrical micromethod. Proc. roy. Soc. B **146**, 339—356 (1957a).

— — The identity of 'intrinsic' and 'extrinsic' acetylcholine receptors in the motor endplate. Proc. roy. Soc. B **146**, 357—361 (1957b).

Eccles, J. C., Katz, B., Kuffler, S. W.: Nature of the "end-plate potential" in curarized muscle. J. Neurophysiool. **4**, 362—387 (1941).

Elmqvist, D., Hoffmann, W. W., Kugelberg, J., Quastel, D. M. J.: An electrophysiological investigation of neuromuscular transmission in Myasthenia gravis. J. Physiol. (Lond.) **174**, 417—434 (1964).

— Quastel, D. M. J.: A quantitative study of endplate potentials in isolated human muscles. J. Physiol. (Lond.) **178**, 505—529 (1965).

Fatt, P.: The electromotive action of ACh at the motor end-plate. J. Physiol. (Lond.) **111**, 408—422 (1950).

— Katz, B.: Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. J. Physiol. (Lond.) **117**, 109—128 (1952).

Furukawa, T., Furukawa, A., Takagi, T.: Fibrillation of muscle fibers produced by ammonium ions and its relation to the spontaneous activity at the neuromuscular junction. Jap. J. Physiol. **7**, 252—263 (1957).

Goldsmith, T. H.: Rates of action of bath-applied drugs at the neuromuscular junction of the frog. J. Physiol. (Lond.) **165**, 368—386 (1963).

Hubbard, J. I., Schmidt, R. F., Yokota, T.: The effect of acetylcholine upon mammalian motor nerve terminals. J. Physiol. (Lond.) **181**, 810—829 (1965).

Jenkinson, D. H.: The antagonism between tubocurarine and substance which depolarize the motor end-plate. J. Physiol. (Lond.) **152**, 309—324 (1960).

Katz, B.: The Croonian lecture: The transmission of impulses from nerve to muscles, and the subcellular unit of synaptic action. Proc. roy. Soc. B **155**, 455—479 (1962).

Koketsu, K.: Action of tetraaethylammonium chloride on neuromuscular transmission in frogs. Amer. J. Physiol. **193**, 213—218 (1958).

Krnjević, K., Miledi, R.: Presynaptic failure of neuromuscular propagation in rats. J. Physiol. (Lond.) **149**, 1—22 (1959).

— Mitchell, J. F.: The release of acetylcholine in the isolated rat diaphragma. J. Physiol. (Lond.) **155**, 246—262 (1961).

Kruckenberg, P.: Die Freisetzung von Acetylcholin durch die motorischen Nervenendigungen. Kybernetik **4**, 113—130 (1968a).

— Sandweg, R.: An analog model for acetylcholine release by motor nerve endings. J. theoret. Biol. **19**, 327—332 (1968b).

— Luschnat, K. D., Sandweg, R., Lichey, J.: Simulierung der Acetylcholinfreisetzung an den motorischen Nervenendigungen durch ein elektrisches Modell. Pflügers. Arch ges. Physiol. **289**, 27 (1966).

— Bauer, H.: Die Auswertung von Endplattenpotentialen (EPP) und Miniaturendplattenpotentialen (MEPP) mit Hilfe des Linc-8-Computers, dargestellt an in

vitro-Ableitungen an Intercostalmuskulatur einer Patientin mit Myasthenia gravis. Pflügers Arch. **307**, 106 (1969).

Liley, A. W., North, K. A. K.: An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. J. Neurophysiol. **16**, 509 to 527 (1953).

Lilleheil, G., Naess, K.: Presynaptic effect of d-tubocurarine. Experientia (Basel) **16**, 550—551 (1960).

— — A presynaptic effect of d-tubocurarine in the neuromuscular junction. Acta physiol. scand. **52**, 120—136 (1961).

Martin, A. R.: A further study of the statistical composition of the end-plate potential. J. Physiol. (Lond.) **130**, 114—122 (1955).

— Quantal nature of synaptic transmission. Physiol. Rev. **46**, 51—66 (1966).

Naess, K.: Effects of brief and protracted curarization. Acta pharmacol. (Kbh.) **8**, 400—408 (1952).

— Addendum to effects of brief and protracted curarization. Acta pharmacol. (Kbh.) **9**, 196—197 (1953).

Nastuk, W. L.: Membrane potential changes at a single muscle endplate produced by transitory application of ACh with an electrically controlled microjet. Fed. Proc. **12**, 102 (1953).

Otsuka, M., Endo, M.: The effect of guanidine on neuromuscular transmission. J. Pharmacol. exp. Ther. **128**, 273—281 (1960).

— Nonomura, Y.: Presynaptic nature of neuromuscular depression. Jap. J. Physiol. **12**, 573—584 (1962).

Riker, W. F., Werner, G., Roberts, J.: Pharmacological evidence for the existence of a presynaptic event in neuromuscular transmission. J. Pharmacol. exp. Ther. **125**, 150—158 (1959b).

— — — Kuperman, A.: The presynaptic event in neuromuscular transmission. Ann. N. Y. Acad. Sci. **81**, 318—344 (1959a).

Sandweg, R.: Über die Funktion der motorischen Endplatte unter dem Einfluß von menschlichem Normalserum. Pflügers Arch. **317**, 252—267 (1970).

— Kruckenberg, P.: Der Einfluß von Normalserum und dessen Ultrafiltrat auf die neuromuskuläre Übertragung. Pflügers Arch. ges. Physiol. **294**, 83 (1967).

Standaert, F. G., Riker, W. F., Jr.: The consequence of cholinergic drug actions on motor nerve terminals. Ann. N. Y. Acad. Sci. **144**, 517—533 (1967).

Stovner, J.: The effect of Tetraaethylammonium (TEA) and temperature on the neuromuscular block produced by magnesium. Acta physiol. scand. **41**, 370—383 (1957).

Takeuchi, A.: The long lasting depression in neuromuscular transmission. Jap. J. Physiol. **8**, 102—113 (1958).

— Takeuchi, N.: Changes in potassium concentration around motor nerve terminals, produced by current flow, and their effects on neuromuscular transmission. J. Physiol. (Lond.) **155**, 46—58 (1961).

Thies, R. E.: Neuromuscular depression and the apparent depletion of transmitter in mammalian muscle. J. Neurophysiol. **28**, 428—442 (1965).

Dr. med. H. Bauer
Medizinische Akademie Lübeck
Kinderklinik
BRD-2400 Lübeck
Kronsdorfer Allee 71—73
Deutschland

Lebenslauf

Am 26.9.1944 wurde ich, Hartmut Bauer, als Sohn des Verwaltungsangestellten Anton Bauer und seiner Ehefrau Waltraud Bauer, geb. Splett, in Greifswald geboren.

1947 kehrte ich aus dem Evakuierungsort nach Berlin zurück und wurde dort im September 1950 in die 25. Volksschule in Berlin-Neukölln eingeschult Von 1956 bis 1963 besuchte ich die Walther-Rathenau-Schule (Realgymnasium) in Berlin-Grunewald, wo ich im Februar 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Am 16.4.1963 wurde ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert, wo ich 1964 die naturwissenschaftliche und 1965 die ärztliche Vorprüfung ablegte.

Seit Januar 1966 war ich Mitarbeiter einer Forschungsgruppe am Physiologischen Institut der Freien Universität.

Im März 1969 bestand ich in Berlin das ärztliche Staatsexamen.

Vom 1. April bis 30. Juni 1969 war ich als Medizinalassistent am Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin in der Abteilung von Prof. Dr. O.H. Gauer angestellt.